

論文内容の要旨

論文提出者氏名 山本 雄士

論文題目

Pluripotent epigenetic regulator OBP 801 maintains filtering blebs in glaucoma filtration surgery model

論文内容の要旨

緑内障は、眼圧が大きな要因となって不可逆性の視神経変性を生じる疾患で、本邦の中途失明原因の第1位である。緑内障に対する現在唯一の治療法は眼圧下降により視神経障害の進行を抑制することであり、緑内障手術のGold Standardは前房から結膜下に房水を導く房水流出路を観血的に作成し、結膜下に房水を貯留する濾過胞を形成させて眼圧下降を図る線維柱帯切除術 (TLE; Trabeculectomy) である。術後は結膜の正常な血管性状を維持し、長期に亘る眼圧下降効果を有することが理想であるが、TLEを含む緑内障濾過手術においては、作成した房水流出路、特に結膜下組織の術後創傷治癒機能的により濾過胞の効果が失われ、実効性ある眼圧下降効果の達成に難渋することが多い。この術後創傷治癒の制御のために用いられている Mitomycin C (MMC) は濾過胞結膜の無血管化などの予後不良因子を惹起する。一方、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi; histone deacetylase inhibitor) は強力な抗線維化作用を有することが知られており、心臓、肝臓、腎臓、肺など臓器の線維性疾患での臨床応用が期待されている。近年、HDACiの一つである Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) が家兎緑内障濾過手術モデルにおいて濾過胞維持効果を示すことが報告された。しかし作用部位で薬理効果可能な濃度を維持するには使用濃度が高濃度であり、臨床応用が困難である。論文提出者は従来の HDACi と比較して遥かに低濃度(1/500, 1nM)で薬理効果を発揮する低分子化合物 OBP-801 (OBP) に注目し、同じく家兎緑内障濾過手術モデルの濾過胞維持に有効であるかどうかを検討した。

培養ヒト結膜線維芽細胞 (HConFs) を用いた *in vitro* モデル実験で、OBP の線維化抑制作用を検証した。OBP は TGF- β 2 または TGF- β 2+TNF- α 刺激で誘導される HConFs の α -SMA 発現を 1nM の濃度で抑制した。すなわち OBP により HConFs の筋線維芽細胞への形質転換が抑制されることを免疫染色で確認した。次いで、TGF- β 2+TNF- α 刺激で誘導される HConFs におけるコラーゲン (type 1, 3, 16) の発現とコラーゲン架橋酵素である lysyl oxidase ファミリー (LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL4) の発現を 1nM OBP が有意に抑制することを qRT-PCR 法で確認した。OBP の投与時期については TGF- β 2+ TNF- α 刺激の 24 時間前に 1nM OBP をまたは同刺激の 5 時間前に 5nM OBP を添加することで HConFs の α -SMA 蛋白発現が有意に抑制されていた。SAHA との比較では、TGF- β 2+TNF- α 刺激で誘導される HConFs の α -SMA と type1 コラーゲンの発現を 1nM OBP は

500nM SAHA と同等に抑制し、薬剤間の有効濃度に大きな差異が認められた。

次いで、家兎を用いて 22G シリコンカニューラで前房と結膜下を短絡する緑内障濾過手術モデルを作成し、*in vivo* 実験を行った。術後投与薬を基に、基剤である BSS (balanced salt solution) を投与した BSS 群、OBP 結膜下注射群、OBP 点眼群、MMC(結膜下注射)群の4群に分け、術後 30 日まで眼圧測定と前眼部観察を行った。術後 2、5、12、30 日に濾過胞組織を採取し、qRT-PCR 法で遺伝子発現を検討した。OBP 結膜下注射群では、BSS 群と比較して TGF- β 3, MMP-2, TIMP-2, 3, LOX, COL1A および SERPINH1 などの線維化に関わる遺伝子発現が術後 30 日時点で有意に抑制されていた。対照的に MMC 群では術後 30 日時点で COL1A, MMP-2, 14, TIMP-1 の発現が亢進していた。蛋白レベルでも術後 30 日の α -SMA と type1 コラーゲンの発現が OBP 結膜下注射群で BSS 群、MMC 群と比較して減少していた。眼圧は、BSS 群では概ね術後 15 日まで眼圧下降が見られたが、その後は眼圧が再上昇した。OBP 結膜下注射群、OBP 点眼群では術後 30 日まで BSS 群と比較して有意に眼圧下降が維持された。MMC 群では過度の低眼圧や高眼圧が生じ眼圧値のバラツキが大きく、術後 30 日の時点で BSS 群との間に眼圧の有意差を認めなかった。BSS 群、OBP 結膜下注射群、OBP 点眼群では過度の低眼圧を生じなかった。前眼部観察では、BSS 群で術後数日は機能的な濾過胞を認めたが、その後濾過胞は縮小し術後 30 日には線維化した平坦な濾過胞となった。OBP 結膜下注射群、OBP 点眼群では術後 30 日まで健常な結膜組織が保たれた機能的な濾過胞を認めた。MMC 群では術後早期に巨大な無血管性濾過胞を認めたが、全例で濾過胞周囲の強い線維化が進行し、徐々に濾過胞は縮小した。どの群においても、薬剤投与に伴う角結膜上皮障害などの有害事象は生じなかった。術後 30 日の濾過胞組織の組織学的解析では、コラーゲンを可視化するピクロシリウスレッド染色を行った。OBP 結膜下注射群は BSS 群と比較して線維化が抑制されていた。一方 MMC 群では線維化の亢進を認めた。免疫染色でも α -SMA と type1 コラーゲンの発現が、OBP 結膜下注射群では BSS 群と比較して抑制されたのに対して、MMC 群では亢進しており、OBP の濾過胞組織における線維化抑制作用が明らかとなった。

OBP は緑内障濾過手術後の結膜下組織の創傷治癒における多様な遺伝子発現を調節し、過剰な線維化を抑制することで家兎緑内障濾過手術モデルに長期に亘る眼圧下降効果もたらした。また健常な結膜組織の維持も可能であった。既報の HDACi よりもはるかに低濃度で薬理効果を発揮するため、緑内障濾過手術後の永続的かつ安全な眼圧下降を目指した臨床応用が期待できる薬剤と考えられた。